

JP05344893A

MicroPatent Report

## **GENE CAPABLE OF CODING ACETOHYDROXY ACID SYNTHASE AND ITS UTILIZATION**

[71] Applicant: MITSUBISHI  
PETROCHEM CO LTD

[72] Inventors: INUI MASAYUKI;  
KOBAYASHI MIKI;  
YUGAWA HIDEAKI

[21] Application No.: JP04153886

[22] Filed: 19920612

[43] Published: 19931227

[Go to Fulltext](#)

**[57] Abstract:**

**PURPOSE:** To obtain the subject gene DNA, isolated from a coryneform bacterium such as *Brevibacterium.flavum* MJ-233, having a specific base sequence and capable of providing a transformant remarkably improved in productivity of L-isoleucine, L-valine, etc. **CONSTITUTION:** *Brevibacterium.flavum* MJ-233 which is a corynebacterium is cultured in a culture medium till the latter period of the logarithmic growth phase and the microbial cell is collected and suspended in a buffer solution containing a lysozyme. Protease K(R) and sodium dodecyl sulfate are then added to carry out the lysis. The resultant lysate is subsequently extracted with a phenol/chloroform solution. Ethanol is added to the extract solution to recover a DNA, which is then treated with a restriction enzyme, bound to a cloning vector and inserted into *Escherichia coli* to perform transformation. The obtained transformant is subsequently cloned to sort out a positive clone. A plasmid is recovered from the obtained strain and treated with a restriction enzyme to afford the objective gene DNA, capable of coding an acetohydroxy acid synthase derived from the coryneform bacterium and expressed by the formula, etc. **COPYRIGHT:** (C)1993, JPO&Japio

[51] Int'l Class: C12N01560 C12N00121 C12P01306 C12P01308  
C12N01560 C12R00113 C12N00121 C12R00113 C12P01306 C12R00113  
C12P01308 C12R00138



(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-344893

(43)公開日 平成5年(1993)12月27日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	F 1	技術表示箇所
C 12 N 15/60	ZNA			
1/21		7236-4B		
// C 12 P 13/06	C 8931-4B			
13/08	D 8931-4B			
	8931-4B	C 12 N 15/00	A	

審査請求 未請求 請求項の数7(全16頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平4-153888	(71)出願人	000006057 三菱油化株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(22)出願日	平成4年(1992)6月12日	(72)発明者	乾 将行 茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号 三菱油化株式会社筑波総合研究所内
		(72)発明者	小林 幹 茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号 三菱油化株式会社筑波総合研究所内
		(72)発明者	湯川 英明 茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号 三菱油化株式会社筑波総合研究所内
		(74)代理人	弁理士 山本 隆也

(54)【発明の名称】 アセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子DNA及びその利用

(57)【要約】

【構成】 ブレビパクテリウム・フラバムM J - 233  
からアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子  
を含むDNA断片を単離し、この遺伝子の塩基配列を決定した。

【効果】 このアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子DNAを導入したコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドで形質転換されたブレビパクテリウム・フラバムM J 233-AHASのL-イソロイシン又はL-バリンの産性能は著しく増加した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネ型細菌由来のアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子DNA。

【請求項2】 コリネ型細菌がプレビバクテリウム・フ

ラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233 である請求項1記載の遺伝子DNA。

【請求項3】 次のDNA塩基配列

ATGACAGGTG CACAGGCAAT TGTTGATCG CTCGAGGAGC TTAACGCCGA CATCGTGGTC 60  
GGTATTCTG GTGGTGCCTG GCTACCGGTG TATGACCCGC TCTATTCCCTC CACAAAGGTG 120  
CGGCCACGTCT TGGTGCGCCA CGAGCAGGGC GCAGGCCACG CAGCAACCGG CTACGCCAG 180  
GTTACTGGAC CGCTTGGCT CTGGATTGCA ACCTCTGGCC CAGGAGCAAC CAACTTGGTT 240  
ACCCCAATCG CTGATGCAAA CTGGACTCC GTTCCCATGG TTGCCCATCAC CGGCCAGGTC 300  
GGAAGTGGCC TGCTGGTAC CGACGCTTTC CAGGAAGGGC ATATCCCGG CATCACCAG 360  
CCAGTGACCA AGCACAACCT CATGGTCACC GACCCCAACG ACATTCCACA GGCATTGGCT 420  
GAGGCATTCC ACCTCGCGAT TACTGGTCGC CCTGGCCCTG TTCTGGTGGA TATTOCTAAG 480  
GATGTCCAGA ACGCTGAATT GGATTCGTC TGGCCACCAA AGATCGACCT GCCAGGGTAC 540  
CGCCCAGTTT CAACACCACA TGCTGCCAG ATCGAGCAGG CAGTCAGCT GATGGTGAG 600  
GCCAAGAACG CCGTCCCTTA CGTTGGAGGC GCGCTTATCA AGGCTGACGC ACACGAAGAG 660  
CTTCGTCGGT TCGCTGAGTA CACCGGCATC CCAGTTGTC CCACCTTGAT GGTTTGGGT 720  
ACTTTCCAG AGTCTCACGA GCTGCACATG GTTATGCCAG GCATGATGG CACTGTTGCC 780  
GCTGTTGGTG CACTGCAGCG CAGCGACCTG CTGATTGCTA TCGGCTCCCG CTTTGATGAC 840  
CGCGTCACCG GTGACGTTGA CACCTTCGGC CCTGACGCCA AGATCATICA CGCCGATATT 900  
GATCCTGGCG AAATCGGAAA GATCAAGCG GTTGAGGTTG CAATCGTGGG CGATGCCCGC 960  
GAAGTTCTTG CTCGCTGCT GGAAACCACC AAGGCAAGCA AGGCAGAGAC CGAGGACATC 1020  
TCCGAGTGGG TTGACTACCT CAAGGGCCTC AAGGCACCTT TCCCACGTGG CTACGACGAG 1080  
CAGCCAGGCG ATCTGCTGGC ACCACAGTTT GTCATTGAAA CCCTGTCCAA GGAAGTTGGC 1140  
CCCGACGCAA TTACTGCCG CGGGCTCGGA CAGCACCCAA TGTGGGCAGC TCAGTTGTT 1200  
GACTTTGAAA AGCCACGAC CTGGCTAAC TCCGGTGGAC TGGGACCAT GGGCTAOGCA 1260  
GTTCTGGGG CCCTGGAGC AAAGGCTGGC GCACCTGACA AGGAAGTCTG GGCTATCGAC 1320  
GGCGACGGCT GTTTCAGAT GACCAACCG GAACTCACCA CCGCCGCACT TGAAGGTTTC 1380  
CCCATTAAGA TCGCACTAAT CAACACCGGA AACCTGGCA TGGTTCGCCA ATGGCAGACC 1440  
CTATTCTATG AAGGACGGTA CTCAAATACT AAACCTGCTA ACCAGGGCGA GTACATGCC 1500  
GACTTTGTTG CCCTTCTGA GGGACTTGGC TGTGTTGCCA TCCGGCTCAC CAAAGGGAG 1560  
GAAGTACTGC CAGCCATCCA AAAGGCTCGA GAAATCAACG ACCGCCAGT AGTCATCGAC 1620  
TTCATCGTGTG GTGAGAGACG ACAGGTATGG CCAATGGTGT CTGCTGGATC ATCCAACCTCC 1680  
GATATCCAGT ACGCACTCGG ATTGGCCCA TTCTTGAGC GCGACGAATC AGCTGCAGAA 1740  
GACCCCTGCAG ACATTCTATGC TTCCGTTGAT TCGACCGAGG CATAA 1785

で示されるアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子DNA。

【請求項4】 次のアミノ酸配列

Met Thr Gly Ala Gln Ala Ile Val Arg Ser Leu Glu Glu Leu Asn Ala  
1 5 10 15  
Asp Ile Val Phe Gly Ile Pro Gly Gly Ala Val Leu Pro Val Tyr Asp  
20 25 30  
Pro Leu Tyr Ser Ser Thr Lys Val Arg His Val Leu Val Arg His Glu  
35 40 45  
Gln Gly Ala Gly His Ala Ala Thr Gly Tyr Ala Gln Val Thr Gly Arg  
50 55 60  
Val Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val  
65 70 75 80  
Thr Pro Ile Ala Asp Ala Asn Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile  
85 90 95  
Thr Gly Gln Val Gly Ser Gly Leu Leu Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu  
100 105 110

Ala Asp Ile Arg Gly Ile Thr Met Pro Val Thr Lys His Asn Phe Met  
 115 120 125  
 Val Thr Asp Pro Asn Asp Ile Pro Gln Ala Leu Ala Glu Ala Phe His  
 130 135 140  
 Leu Ala Ile Thr Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp Ile Pro Lys  
 145 150 155 160  
 Asp Val Gln Asn Ala Glu Leu Asp Phe Val Trp Pro Pro Lys Ile Asp  
 165 170 175  
 Leu Pro Gly Tyr Arg Pro Val Ser Thr Pro His Ala Arg Gln Ile Glu  
 180 185 190  
 Gln Ala Val Lys Leu Ile Gly Glu Ala Lys Lys Pro Val Leu Tyr Val  
 195 200 205  
 Gly Gly Gly Val Ile Lys Ala Asp Ala His Glu Glu Leu Arg Ala Phe  
 210 215 220  
 Ala Glu Tyr Thr Gly Ile Pro Val Val Thr Thr Leu Met Ala Leu Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Phe Pro Glu Ser His Glu Leu His Met Gly Met Pro Gly Met His  
 245 250 255  
 Gly Thr Val Ser Ala Val Gly Ala Leu Gln Arg Ser Asp Leu Leu Ile  
 260 265 270  
 Ala Ile Gly Ser Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Asp Val Asp Thr  
 275 280 285  
 Phe Ala Pro Asp Ala Lys Ile Ile His Ala Asp Ile Asp Pro Ala Glu  
 290 295 300  
 Ile Gly Lys Ile Lys Gln Val Glu Val Pro Ile Val Gly Asp Ala Arg  
 305 310 315 320  
 Glu Val Leu Ala Arg Leu Leu Glu Thr Thr Lys Ala Ser Lys Ala Glu  
 325 330 335  
 Thr Glu Asp Ile Ser Glu Trp Val Asp Tyr Leu Lys Gly Leu Lys Ala  
 340 345 350  
 Arg Phe Pro Arg Gly Tyr Asp Glu Gln Pro Gly Asp Leu Leu Ala Pro  
 355 360 365  
 Gln Phe Val Ile Glu Thr Leu Ser Lys Glu Val Gly Pro Asp Ala Ile  
 370 375 380  
 Tyr Cys Ala Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Val  
 385 390 395 400  
 Asp Phe Glu Lys Pro Arg Thr Trp Leu Asn Ser Gly Gly Leu Gly Thr  
 405 410 415  
 Met Gly Tyr Ala Val Pro Ala Ala Leu Gly Ala Lys Ala Gly Ala Pro  
 420 425 430  
 Asp Lys Glu Val Trp Ala Ile Asp Gly Asp Gly Cys Phe Gln Met Thr  
 435 440 445  
 Asn Gln Glu Leu Thr Thr Ala Ala Val Glu Gly Phe Pro Ile Lys Ile  
 450 455 460  
 Ala Leu Ile Asn Asn Gly Asn Leu Gly Met Val Arg Gln Trp Gln Thr  
 465 470 475 480  
 Leu Phe Tyr Glu Gly Arg Tyr Ser Asn Thr Lys Leu Arg Asn Gln Gly  
 485 490 495  
 Glu Tyr Met Pro Asp Phe Val Ala Leu Ser Glu Gly Leu Gly Cys Val  
 500 505 510

Ala Ile Arg Val Thr Lys Ala Glu Glu Val Leu Pro Ala Ile Gln Lys		
515	520	525
Ala Arg Glu Ile Asn Asp Arg Pro Val Val Ile Asp Phe Ile Val Gly		
530	535	540
Glu Asp Ala Gln Val Trp Pro Met Val Ser Ala Gly Ser Ser Asn Ser		
545	550	555
Asp Ile Gln Tyr Ala Leu Gly Leu Arg Pro Phe Phe Asp Gly Asp Glu		
565	570	575
Ser Ala Ala Glu Asp Pro Ala Asp Ile His Ala Ser Val Asp Ser Thr		
580	585	590
Glu Ala		

で示されるアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子DNA。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド。

【請求項6】 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子DNAと、コリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNAを保有する組換えプラスミド。

【請求項7】 請求項6記載の組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、アセトヒドロキシ酸シンターゼ (E. C. 4. 1. 3. 18) をコードする遺伝子を含むコリネ型細菌由来の遺伝子DNA、該遺伝子DNAを含む組換えプラスミド、該プラスミドで形質転換されたコリネ型細菌、及び該コリネ型細菌を用いるL-イソロイシン又はL-バリンの製造法に関する。

【0002】L-イソロイシン及びL-バリンは必須アミノ酸の1つであり、人間及び動物の栄養上重要な役割をするアミノ酸として、医薬、食品、飼料添加剤に配合されており、その需要が近年急激に増加しつつある。

##### 【0003】

【従来の技術】L-イソロイシンは、他のアミノ酸の場合と同様に立体異性が存在する為、L体のみ化学合成することは一般に困難であり、工業的には主に醸酵法により生産が行われている。醸酵法による生産としては、例えばDL- $\alpha$ -アミノ酪酸、スレオニン等のL-イソロイシンの前駆物質を使用する方法(特公昭43-8709号、同40-2880号公報等参照)、前駆物質を特に加えない所謂直接醸酵法(特公昭38-7091号公報、特開昭49-93586号公報等参照)等の技術が開示されている。

【0004】一方、L-イソロイシンの酵素法による生産としては、例えば、アンモニウムイオン又はイソロイシン以外のL-若しくはDL-アミノ酸の存在下に、D-、L-、又はDL- $\alpha$ -ケト- $\beta$ -メチル吉草酸からL-イソロイシンを製造する方法(特公昭46-29789号公報参照)；アンモニウムイオン又はイソロイシン以外のL-若しくはDL-アミノ酸の存在下に、D-

イソロイシンあるいはD-アロイソロイシンの単独もしくは混合物、又はこれらとその光学異性体との適宜混合物を変換せしめてL-イソロイシンを製造する方法(特公昭46-29788号公報参照)；セラチア (Seratia) 属細菌の固定化物を用いてグルコースとD-スレオニンからL-イソロイシンを製造する方法(日本醸酵工業会大会講演要旨集p. 47～48、昭和52年度)等が報告されている。

【0005】しかしながらこれらの方法は、原料費が嵩む、収率が低い等の問題があり、十分に満足しうるものではない。また、L-バリンの工業的製法としては、L-イソロイシンの場合と同様に立体異性体が存在するので、化学合成法ではL-体のみの製造は困難であり、主として発酵法によっている。しかしながら、公知の発酵法によるL-バリンの製法では、対糖収率が低いことや、L-バリンの蓄積に限界があるため、新たな観点でL-バリンを効果的に生成せしめる方法の提供が強く望まれていた。

##### 【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、コリネ型細菌由来のアセトヒドロキシ酸シンターゼ (E. C. 4. 1. 3. 18) をコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を同種であるコリネ型細菌に導入し、該コリネ型細菌を用いて、新たな観点から効率的にL-イソロイシン又はL-バリンを製造することである。

##### 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、コリネ型細菌染色体よりアセトヒドロキシ酸シンターゼ遺伝子を単離し、該遺伝子を適当なベクタープラスミドに導入して、コリネ型細菌を形質転換し、該形質転換されたコリネ型細菌を用いると、効率的にL-イソロイシン又はL-バリンを製造しうることを見い出し本発明を完成するに至った。

【0008】かくして、本発明によれば、(1) コリネ型細菌由来のアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子DNA、(2) 該遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド、(3) 該組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌、及び(4) 該形質転換さ

れたコリネ型細菌を用い、グルコースを原料としてレーソロイシン又はレバリンを製造する方法が提供される。

【0009】以下、本発明についてさらに詳細に説明する。本発明の「アセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子DNA」は $\alpha$ -ケト酪酸にビルピン酸を付加して $\alpha$ -アセト- $\alpha$ -ヒドロキシ酪酸を合成する酵素、あるいは、ビルピン酸2分子から $\alpha$ -アセト乳酸を合成する酵素、すなわちアセトヒドロキシ酸シンターゼ

(E. C. 4. 1. 3. 18) をコードする遺伝子DNA Aを意味する。

【0010】アセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(以下、これを「A断片」と略称することがある)は、その塩基配列が決定された後は合成することも可能であるが、一般にはアセトヒドロキシ酸シンターゼ生産性を有する微生物からクローニングすることができ、その供給源となる微生物としては、コリネ型細菌、特にブレビバクテリウム・フラバム(Brevibacterium flavum) MJ-233(FERM BP-1497)およびその由来株が有利に使用される。

【0011】これらの供給源微生物からA断片を調製するための基本的操作の一例を述べれば次のとおりである: A断片は、上記コリネ型細菌、例えばブレビバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)株の染色体上に存在し、この染色体を適当な制限酵素で切断することにより生ずる切断断片の中から以下に述べる方法で分離、取得することができる。

【0012】先ず、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株の培養物から染色体DNAを抽出する。この染色体DNAを適当な制限酵素、例えばEcoRIを用いて染色体DNAを完全に分解する。

【0013】得られるDNA断片をクローニングベクター、例えばpHSG399(宝酒造製)に挿入し、このベクターを用いてアセトヒドロキシ酸シンターゼ遺伝子が欠損したイソロイシン及びバリン要求性大腸菌変異株

エシェリヒア・コリM1262[エシェリヒア・コリジエネティック・ストックセンター(Escherichia coli Genetic Stock Center)、デパートメント・オブ・バイオロジー、エール・ユニバーシティ(Department of Biology, Yale University); P. O. Box 6666 New Haven, CT 06511-744, U. S. A. 保存菌株]を形質転換し、選択培地に塗抹することにより、形質転換株を得る。得られる形質転換株よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由來のA断片を確認・取得することができる。

【0014】かくして得られるA断片をさらに適当な制限酵素を用いて切断し、得られるDNA断片を、大腸菌で複製可能なベクタープラスミドに挿入し、このベクタープラスミドを通常用いられる形質転換法、例えば、塩化カルシウム法、電気パルス法等による形質転換により前記イソロイシン及びバリン要求性大腸菌変異株に導入し、選択培地に塗抹する。

【0015】得られる形質転換体よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより、挿入されたブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由來のA断片を確認・取得することができる。このようにして得られるA断片の一つは、上記ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株の染色体DNAを制限酵素EcoRIの完全分解により切り出し、さらにそれを制限酵素SaciIで切断することによって得られる大きさが約3.4kbのDNA断片を挙げることができる。

【0016】この約3.4kbのアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を、各種の制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記表1に示す。

【0017】

【表1】

表1

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ(kb)							
KpnI	1	1.	75	1.	65				
NcoI	2	1.	7	0.	95	0.	75		
EcoRV	2	1.	8	1.	3	0.	3		
Eco065I	3	1.	65	1.	55	0.	15	0.	05

【0018】なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片又はプラスミドを、制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動および5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。

【0019】また、「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合に

は、エシェリヒア・コリのラムダファージ( $\lambda$  phage)のDNAを制限酵素HindIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上で泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ( $\phi$ X174 phage)のDNAを制限酵素HaeIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリ

ルアミドゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを算出する。プラスミドの大きさは、切断断片それぞれの大きさを加算して求める。なお、各DNA断片の大きさの決定において、1 kb以上の断片の大きさについては、1%アガロースゲル電気泳動によって得られる結果を採用し、約0.1 kbから1 kb未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られる結果を採用した。

【0020】一方、上記したプレビバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAを制限酵素EcoRI、SacIによって切断することにより得られる大きさが約3.4 kbのDNA断片については、その塩基配列をプラスミドpUC118及びまたはpUC119(宝酒造製)を用いるジデオキシスクレオチド酵素法(dideoxy chain termination法、Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, p5463, 1977)により決定することができる。このようにして決定した上記約3.4 kbのDNA断片の塩基配列のオープンリーディングフレームの存在から決定したアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子は、後記する配列表の配列番号：1に示す配列を有するものであり、594個のアミノ酸をコードする1782塩基対から構成されている。

【0021】上記した、後記配列表の配列番号：1に示す塩基配列を包含して成る本発明のアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片は、天然のコリネ型細菌染色体DNAから分離されたもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばベックマン社製System-1 Plusを用いて合成されたものであってもよい。

【0022】また、前記の如くプレビバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAから取得される本発明のDNA断片は、アセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されてもよく又は削除されていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらに塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明のアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片に包含されるものである。

【0023】以上に詳述した大きさが約3.4 kbのDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。本発明のアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A断片)は、適当なプラスミドベクター、例えば、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少くとも含むプラスミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌内でアセトヒドロキシ酸シンターゼの高発現可能な組換えプラスミドを得るこ

とができる。

【0024】また、本発明のアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を発現させるためのプロモーターは、コリネ型細菌が保有する該遺伝子自身のプロモーターであることができるが、それに限られるものではなく、アセトヒドロキシ酸シンターゼ遺伝子の転写を開始させるための原核生物由来の塩基配列であれば、いかなるプロモーターであってもよい。

【0025】本発明のA断片を導入することができる、コリネ型細菌内の複製増殖機能を司る遺伝子を少くとも含むプラスミドベクターとしては、例えば、特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30；特開平2-276575号公報に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX；特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2及U-pCRY3；特開昭58-67679号公報に記載のpAM330；特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519；特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ1844；特開昭57-134500号に記載のpCG1；特開昭58-35197号公報に記載のpCG2；特開昭57-183799号公報に記載のpCG4及びpCG11等を挙げることができる。

【0026】中でもコリネ型細菌の宿主ベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子とをもつものが好ましく、例えばプラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX等が好適に使用される。

【0027】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する方法としては、プレビバクテリウム・スタチオニス(Brevibacterium stationis)IFO12144(FERM BP-2515)からプラスミドpBY503(このプラスミドの詳細については特開平1-95785号公報参照)DNAを抽出し、制限酵素XbaIで大きさが約4.0 kbのプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出し、制限酵素EcoRIおよびKpnIで大きさが約2.1 kbのプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出す。これらの両断片をプラスミドpHSG298(宝酒造製)のEcoRI、KpnI部位及びSalI部位に組み込むことにより、プラスミドベクターpCRY30を調製することができる。

【0028】次に、上記プラスミドベクターへの本発明のA断片の導入は、例えば、プラスミドベクター中に1個所だけ存在する制限酵素部位を該制限酵素で開裂し、そこに前記A断片および開裂したプラスミドベクターを

必要に応じてS 1ヌクレアーゼで処理して平滑末端とするか、または適当なアダプターDNAの存在下にDNAリガーゼ処理で連結させることにより行うことができる。

【0029】プラスミドp CRY 30への本発明のA断片の導入は、プラスミドp CRY 30を制限酵素E c o R Iで開裂させ、そこに前記アセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片（A断片）をDNAリガーゼで連結させることにより行うことができる。このようにして造成されるプラスミドp CRY 30に本発明の大きさが約3.4 kbのA断片を導入した組換えプラスミドは、L-イソロイシン及びL-バリンの製造に好適に用いることができる組換えプラスミドの一つであり、本発明者らはこれをプラスミドp CRY 30-AHASと命名した。プラスミドp CRY 30-AHASの作成方法の詳細については、後記実施例4で説明する。

【0030】このようにして造成されるアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含むコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドを、宿主微生物に導入して該微生物の培養物を用いてL-イソロイシン及びL-バリンを安定に効率よく生産することが可能となる。本発明によるプラスミドで形質転換しうる宿主微生物としては、コリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497)、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233-AB-41 (FERM BP-1498)、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233-ABT-11 (FERM BP-1500)、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233-ABD-21 (FERM BP-1499)等が挙げられる。

【0031】なお、上記のFERM BP-1498の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としてDL- $\alpha$ -アミノ酸耐性を積極的に付与されたエタノール資化性微生物である(特公昭59-28398号公報第3~4欄参照)。また、FERM BP-1500の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としたL- $\alpha$ -アミノ酸トランスアミナーゼ高活性変異株である(特開昭62-51998号公報参照)。さらに、FERM BP-1499の菌株はFERM BP-1497の菌株を親株としたD- $\alpha$ -アミノ酸デアミナーゼ高活性変異株である(特開昭61-177993号公報参照)。

【0032】これらの微生物の他に、プレビバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC6871、同ATCC13745、同ATCC13746；プレビバクテリウム・デバリカタム (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC14020；プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (*Brevi*

*bacterium lactofermentum*) ATCC13869；コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831等を宿主微生物として用いることもできる。

【0033】なお、宿主としてプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来の菌株を用いる場合、本菌株が保有するプラスミドp BY 502 (特開昭63-36787号公報参照)のため、形質転換が困難である場合があるので、そのような場合には、本菌株よりプラスミドp BY 502を除去することが望ましい。そのようなプラスミドp BY 502を除去する方法としては、例えば、継代培養を繰り返すことにより自然に消失させることも可能であるし、人為的に除去することも可能である [Bact. Rev., 36, p. 361~405 (1972) 参照]。上記プラスミドp BY 502を人為的に除去する方法の一例を示せば次のとおりである。

【0034】宿主プレビバクテリウム・フラバムMJ-233の生育を不完全に阻害する濃度のアクリジンオレンジ (濃度: 0.2~50 μg/ml) もしくはエチジウムプロミド (濃度: 0.2~50 μg/ml) 等を含む培地に、1 ml 当り約10細胞になるように植菌し、生育を不完全に阻害しながら、約24時間約35℃で培養する。培養液を希釈後寒天培地に塗布し、約35℃で約2日培養する。出現したコロニーから各々独立にプラスミド抽出操作を行い、プラスミドp BY 502が除去されている株を選択する。この操作によりプラスミドp BY 502が除去されたプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株が得られる。

【0035】このようにして得られるプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株への前記プラスミドの形質転換法としては、エシェリヒア・コリ及びエルビニア・カロトボラについて知られているように [Calvin, N. M. and Hanawalt, P. C., Journal of Bacteriology, 170, 2796 (1988); Ito, K., Nishida, T. and Izaki, K., Agricultural and Biological Chemistry, 52, 293 (1988) 参照]、DNA受容菌へのパルス波通電 [Satoh, Y. et al., Journal of Industrial Microbiology, 5, 159 (1990) 参照]によりプラスミドを導入することが可能である。

【0036】上記の方法で形質転換して得られるアセトヒドロキシ酸シンターゼ產生能を有するコリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来株の培養方法を以下に述べる。培養は炭素源、窒素源、無機塩等を含む通常の栄養培地で行うことができ、炭素源としては、例えばグルコース、エタノール、メタノー

ル、鹿糖蜜等が、そして窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素等がそれぞれ単独もしくは混合して用いられる。また、無機塩としては、例えばリン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等が用いられる。この他にペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスティーブリカ、カザミノ酸、ビオチン等の各種ビタミン等の栄養源を培地に添加することができる。

【0037】培養は、通常、通気搅拌、振盪等の好気条件下に、約20～約40℃、好ましくは約25℃～約35℃の温度で行うことができる。培養途中のpHは5～10、好ましくは7～8付近とすことができ、培養中のpH調整は酸又はアルカリを添加して行うことができる。培養開始時の炭素源濃度は、好ましくは1～5容量%、更に好ましくは2～3容量%である。また、培養期間は通常1～7日間とすことができ、最適期間は3日間である。

【0038】このようにして得られる培養物から各々菌体を集めて、水又は適当な緩衝液で洗浄し、L-イソロイシン又はL-バリン生成反応に使用することができる。L-イソロイシン又はL-バリン生成反応においては、これらの菌体をそのまま用いることができ、あるいは超音波処理等を加えた菌体破碎物又はそれから分離された粗酵素もしくは精製酵素として、あるいは適当な担体に固定化して用いることができる。以上に述べた如き菌体の破碎物、粗もしくは精製酵素、固定化物等を本明細書ではまとめて「菌体処理物」という。

【0039】しかして本発明に従えば、上記培養菌体又は菌体処理物の存在下に、少くとも炭素源と窒素源を含有する水性反応液中に酵素反応させてL-イソロイシン又はL-バリンを生成せしめることを特徴とするL-イソロイシン又はL-バリンの製造法が提供される。上記の酵素反応は、通常約20～約40℃、好ましくは約25～約35℃の範囲内で行うことができる。

【0040】水性反応液中に添加することができる炭素源、窒素源は、前記した通常の栄養培地に用いられるものを挙げることができる。また該水性反応液には、前記した通常の栄養培地に用いることができる無機塩等を添加するこもできる。特に、本発明のプラスミドで形質転換しうる宿主微生物がビオチン要求性のコリネ型細菌である場合は、上記の如く調製された培養菌体またはその固定化物と、少なくとも炭素源と窒素源とを含有しかつビオチンを含有しない水性反応液中で、酵素反応させてL-イソロイシン又はL-バリンを生成せしめるのが好適である。この場合、ビオチン要求性のコリネ型細菌はビオチンを実質的に含有しない水性反応液中では菌体増殖せずに、該菌体の保有する代謝系において炭素源及び窒素源がエネルギー共役を伴う酵素反応を介して反応せしめられ、L-イソロイシン又はL-バリンが製造され

る。

【0041】しかして本発明に従えば、(1) 上記培養菌体又はその固定化物の存在下に、少くともエタノールと酪酸誘導体をビオチンを含有しない水性反応液中に酵素反応させてL-イソロイシンを生成せしめることを特徴とするL-イソロイシンの製造法、(2) 上記培養菌体又はその固定化物の存在下に、少くともグルコースを含有する水性反応液中に酵素反応させてL-バリンを生成せしめることを特徴とするL-バリンの製造法が提供される。

【0042】上記した、本発明に従う水性反応液は、ビオチンを実質的に含有しない水あるいはリン酸またはトリス塩酸等の緩衝液であることもできるが、好ましくはビオチンを含有しない合成培地が用いられる。この合成培地には、酵母エキス、ペプトン、コーンスティーブリカー等の天然栄養物質を含まない化学構造が既知の無機窒素源及び/又は無機物を含有する水溶液が含まれる。本発明において用いうる合成培地の無機窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等を例示することができ、また、無機物としては、例えば、リン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン、硫酸鉄等を例示することができる。これらの無機窒素源および無機塩はそれぞれ、単独でまたは2種以上混合して用いることができる。

【0043】本発明に従うL-イソロイシン又はL-バリンの製造法において用いられる合成培地の一例を示すと次のとおりである： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g/l ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g/l ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 g/l ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/l ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  20 ppm ;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$  20 ppm 含有する pH 7.6 の水溶液。

【0044】本発明のL-イソロイシン又はL-バリン製造法において使用される前記のようにして調製された培養菌体又は菌体処理物の使用量は、特に制限されるものではないが、培地の容量を基準にして一般に1～50% (w t/v o l) 、好ましくは2～20% (w t/v o l) の範囲内の濃度で使用することができる。上記したとおりの組成を有する水性反応液中における培養菌体又は菌体処理物を用いる酵素反応は、一般に約20～約50℃、好ましくは約30～約40℃の温度で通常約10～約72時間行うことができる。

【0045】本発明に従うL-イソロイシンの製造法においては、上記したビオチンを含有しない水性反応液中に、エタノールと酪酸誘導体と窒素源とが酵素反応せしめられL-イソロイシンが生成される。L-イソロイシン製造に際しての、水性反応液中のエタノールの濃度は通常0.5～40容量%、好ましくは1～20容量%の範囲内とすることができる。水性反応液中の酪酸誘導体としては、例えば、DL-α-アミノ酸、α-ケト

酪酸又はそれらの塩類を挙げることができる。水性反応液中の酪酸誘導体の濃度は、通常0.1～20% (w t / v o l) の濃度範囲で使用するのが適当であるが、特に $\alpha$ -ケト酪酸又はその塩を使用する場合は、反応液中の濃度が常に0.3% (w t / v o l) を越えずに添加すると、副生物であるノルバリンの生成を低減し、L-イソロイシンの収率も向上させうことができる。上記した反応基質の添加は、上記濃度を越えないかぎり連続的に行ってもよく、あるいは間欠的に行っててもよい。反応に使用される上記した酪酸誘導体の塩としては、例えば、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属塩類；カルシウム等のアルカリ土類金属塩類；アンモニウム塩等が挙げられ、それらの中でもナトリウム塩が好適である。

【0046】また、本発明に従うL-バリンの製造法においては、上記したビオチンを含有しない水性反応液中に、グルコースと窒素源とが酵素反応せしめられL-バリンが生成される。L-バリン製造に際しての、水性反応液中のグルコース濃度は、通常0.1～5.0重量%の範囲内とすることができます。グルコースは反応中上記範囲内の濃度に維持されるように連続的または間欠的に水性反応液に添加するのが好ましい。

【0047】かくして製造されるL-イソロイシン又はL-バリンの水性反応液からの分離、精製は、それ自体既知の通常用いられる方法に従って行なうことができ、例えば、イオン交換樹脂処理法、晶析法等の方法を適宜組合せて行なうことができる。

#### 【0048】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施例によりさらに具体的に説明する。

##### 実施例1

プレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来のアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A断片)のクローニング

##### 【0049】(A) プレビバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNAの抽出

半合成培地A培地【組成：尿素2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g、 $\text{MgSO}_4$  0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6mg、 $\text{MnSO}_4$  4～6 $\text{H}_2\text{O}$  6mg、酵母エキス2.5g、カゼミノ酸5g、ビオチン200 $\mu\text{g}$ 、塩酸チアミン200 $\mu\text{g}$ 、グルコース20g、蒸留水11l】1lに、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めめた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む10mM NaCl-20mMトリス緩衝液(pH8.0)-1mM EDTA-2Na溶液1.5mlに懸濁した。次にプロテナーゼKを、最終濃度が100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、37℃で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.

5%になるように添加し、50℃で6時間保温して溶菌した。この溶菌液に、等量のフェノール／クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全盤を遠心分離(5,000×g、20分間、10～12℃)し、上清液分を分取し、酢酸ナトリウムを0.3Mとなるように添加した後、2倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに10mMトリス緩衝液(pH7.5)-1mM EDTA-2Na溶液5mlを加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

##### 【0050】(B) 組換え体の創製

上記(A)項で得たプレビバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNA溶液の90 $\mu\text{l}$ を制限酵素EcoRI-50unitsを用い、37℃で1時間反応させ完全分解した。このEcoRI分解DNAにクローニングベクターpHSG399(宝酒造より市販)を制限酵素EcoRIで切断した後、脱リン酸化処理したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>及びT<sub>4</sub>DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、4℃で15時間反応させ、結合させた。

##### 【0051】(C) アセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含むプラスミドの選択

上記遺伝子の選抜は、大腸菌変異株エシェリヒア・コリM1262を用いて行った。上記(B)項で得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法(Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970)により前記エシェリヒア・コリM1262を形質転換し、クロラムフェニコール50mgを含む選択培地 [ $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1g、グルコール20g、ロイシン20mg、チアミン1mg及び寒天16gを蒸留水1lに溶解]に塗抹した。

【0052】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpHSG399の長さ2.2kbのDNA断片に加え、長さ約5.8kbの挿入DNA断片が認められた。本プラスミドをpHSG399-AHASと命名した。

##### 【0053】(D) アセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A断片)のサブクローニング

上記(C)項で得たプラスミドpHSG399-AHASに含まれるDNA挿入断片を、必要な部分だけに小型化するために、プラスミドpUC119(宝酒造より市販)アセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子

を含むDNA断片を下記のとおりサブクローニングした。

【0054】上記(C)項で得たプラスミドpHSG399-AHASを制限酵素EcoRI、SacIで切断したものと、プラスミドpUC119を制限酵素EcoRI、SacIで切断したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>及びT<sub>4</sub>DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12°Cで15時間反応させ、結合させた。

【0055】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法(Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970)により前記エシェリヒア・コリMI262を形質転換し、アンビシン50mgを含む選択培地[K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g、グルコール20g、ロイシン20m

表2 プラスミドpUC119-AHAS

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ(kb)
KpnI	2	4.85 1.75
Ncol	2	5.65 0.95
EcoRV	2	5.25 1.35

上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpUC119-AHASと命名した。

【0059】以上によりアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含む大きさが約3.4kbのDNA断片(EcoRI-SacI断片)を得ることができた。

#### 【0060】実施例2

アセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子の塩基配列の決定

実施例1の(D)項で得られたアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含む長さ約3.4kbのDNA断片について、その塩基配列をプラスミドpUC118及びpUC119を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法(dideoxy chain termination法)(Sahger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463, 1977)により図2に示した戦略図に従って決定した。

【0061】その塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から、アセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子は、後記配列表の配列番号:1に示す塩基配列を有する594個のアミノ酸をコードする1782の塩基対より構成されていた。

#### 【0062】実施例3

コリネ型細菌内で複製し安定なプラスミドベクターpCRY30の作成

##### (A) プラスミドpBY503の調製

g、チアミン1mg及び寒天16gを蒸留水1lに溶解]に涂抹した。

【0056】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpUC119の長さ3.2kbのDNA断片に加え、長さ約3.4kbの挿入DNA断片が認められた。各種の制限で切断したときの、長さ約3.4kbのDNA断片の制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは前記表1に示したとおりであった。このDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。

【0057】また上記で得たプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表2に示す。

#### 【0058】

##### 【表2】

プラスミドpBY503は、プレビバクテリウム・スタチオニスIFO12144(FERM BP-2515)から分離された分子量約10メガダルトンのプラスミドであり、特開平1-95785号公報に記載のようにして調製した。

【0063】半合成培地A培地[尿素2g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g、MgSO<sub>4</sub> 0.5g、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 6mg、MnSO<sub>4</sub>·4~6H<sub>2</sub>O 6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ピチオン200μg、塩酸チアミン200μg、グルコース20g及び蒸留水1l]1lに、プレビバクテリウム・スタチオニスIFO12144を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む緩衝液[25mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、10mMのEDTA、50mMグルコース]20mlに懸濁し、37°Cで1時間反応させた。反応液にアルカリ-SDS液[0.2N NaOH、1%(W/V) SDS]40mlを添加し、緩やかに混和して室温にて15分間静置した。次に、この反応液に酢酸カリウム溶液(5M酢酸カリウム溶液60ml、酢酸1.5ml、蒸留水28.5mlの混合液)30mlを添加し、充分混和してから氷水中に15分間静置した。

【0064】溶菌物全量を遠心管に移し、4°Cで10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、上澄液を得た。これに等量のフェノールークロロホルム液(フェノール:クロロホルム=1:1混和液)を加え懸濁した

後、遠心管に移し、室温下で5分間、 $15,000 \times g$ の遠心分離にかけ、水層を回収した。水層に2倍量のエタノールを加え、 $-20^{\circ}\text{C}$ で1時間静置後、 $4^{\circ}\text{C}$ で10分間、 $15,000 \times g$ の遠心分離にかけ、沈澱を回収した。

【0065】沈澱を減圧乾燥後、TE緩衝液〔トリス10mM、EDTA 1mM; HClにてpH8.0に調製〕2mlに溶解した。溶解液に塩化セシウム溶液〔5倍濃度のTE緩衝液100mlに塩化セシウム170gを溶解させた液〕15mlと10mg/mlエチジウムプロマイド溶液1mlを加えて、密度を1.392g/mlに合わせた。この溶液を $12^{\circ}\text{C}$ で42時間、 $116,000 \times g$ の遠心分離を行った。

【0066】プラスミドpBY503は紫外線照射により遠心管内で下方のバンドとして見い出される。このバンドを注射器で遠心管の側面から抜きとることにより、プラスミドpBY503を含む分画液を得た。次いでこの分画液を等量のイソアミルアルコールで4回処理してエチジウムプロマイドを抽出除去し、その後にTE緩衝液に対して透析を行った。このようにして得られたプラスミドpBY503を含む透析液に3M酢酸ナトリウム溶液を最終濃度30mMに添加した後、2倍量エタノールを加え、 $-20^{\circ}\text{C}$ 1時間静置した。この溶液を $15,000 \times g$ の遠心分離にかけてDNAを沈降させ、プラスミドpBY503を $50\mu\text{g}$ 得た。

#### 【0067】(B) プラスミドベクターpCRY30の作成

プラスミドpHSG298(宝酒造製)  $0.5\mu\text{g}$ に制限酵素SalI(5units)を $37^{\circ}\text{C}$ 1時間反応させ、プラスミドDNAを完全に分解した。前記(A)項で調製したプラスミドpBY503の $2\mu\text{g}$ に制限酵素XbaI(1unit)を $37^{\circ}\text{C}$ で30分間反応させ、プラスミドDNAを部分分解した。

【0068】両者のプラスミドDNA分解物を混合し、制限酵素を不活性化するために $65^{\circ}\text{C}$ で10分間加熱処理した後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々50mMトリス緩衝液pH7.6、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mMジチオスレイトール、1mM ATP及びT<sub>4</sub>DNAリガーゼ1unitになるように各成分を強化し、 $16^{\circ}\text{C}$ で15時間保温した。この溶液を用いてエシェリヒア・コリJM109コンピテントセル(宝酒造製)を形質転換した。

【0069】形質転換株は $30\mu\text{g}/\text{ml}$ (最終濃度)のカナマイシン、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ (最終濃度)のIP-TG(イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド) $100\mu\text{g}/\text{ml}$ (最終濃度)のX-gal(5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド)を含むL培地(トリプトン10g、酵母エキス5g、NaCl 5g及び蒸留水1l、pH7.2)で $37^{\circ}\text{C}$ にて24時間培養し、生育株として得られ

た。これらの生育株のうち、白いコロニーで生育してきたものを選択し、各々プラスミドをアルカリ-SDS法〔T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, "Molecular cloning" (1982) p90~91参照〕により抽出した。

【0070】その結果、プラスミドpHSG298のSalI部位にプラスミドpBY503由来の約4.0kbの断片が挿入されたプラスミドpHSG298 oriが得られた。次に同様の方法を用い、前記(A)項で得られたプラスミドpBY503DNAを制限酵素KpnI及びEcoRIにて処理して得られる約2.1kbのDNA断片を上記プラスミドpHSG298 oriのKpnI及びEcoRI部位にクローニングし、プラスミドベクターpCRY30を調製した。

#### 【0071】実施例4

##### プラスミドpCRY30-AHASの作成及びコリネ型細菌への導入

実施例1の(C)項で得られたプラスミドpHSG399-AHAS  $5\mu\text{g}$ を制限酵素EcoRI、SacIを各5units用い、 $37^{\circ}\text{C}$ で1時間反応させ分解し、平滑末端処理したものと、EcoRIリンカー(宝酒造より市販)  $1\mu\text{l}$ を混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>およびT<sub>4</sub>DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、 $12^{\circ}\text{C}$ で15時間反応させ結合させた。

【0072】このDNAを制限酵素EcoRI 3unitsを用い $37^{\circ}\text{C}$ で1時間反応させ分解したものと、実施例3の(B)項で得られたプラスミドpCRY30  $1\mu\text{g}$ を制限酵素EcoRI 1unitを用い、 $37^{\circ}\text{C}$ で1時間反応させ分解したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>およびT<sub>4</sub>DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、 $12^{\circ}\text{C}$ で15時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて、前記方法に従い前記エシェリヒア・コリM1262株を形質転換し、カナマイシン $50\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む選択培地[K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g、グルコース20g、ロイシン20mg、チアミン1mg及び寒天16gを蒸留水1lに溶解]に塗抹した。

【0073】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpCRY30の長さ8.6kbのDNA断片に加え、大きさ3.4kbの挿入DNA断片が認められた。上記の如く調製されたプラスミドDNAを、コリネ型細菌へ形質転換した。

【0074】形質転換は、電気パルス法を用いて次のとおり行った。プレビバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) プラスミドpBY502除去株を100mlの前記A培地で対数増殖初期まで培養し、ペニシリンGを1ユニット/mlになるように添加して、さらに2時間振盪培養し、遠心分離により菌体を集め、菌体を20mlのパルス用溶液(272mM

Sucrose, 7mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7.4) にて洗浄した。さらに菌体を遠心分離してを集め、5mlのパルス用溶液に懸濁し、0.75mlの細胞と、前記で得られたプラスミドDNA溶液50μlとを混合し、水中にて20分間静置した。ジ

ーンバルサー（バイオラド社製）を用いて、2500ボルト、25μFDに設定し、パルスを印加後水中に20分間静置した。全量を3mlの前記A培地に移し30℃にて1時間培養後、カナマイシン15μg/ml（最終濃度）を含む前記A寒天培地に植菌し30℃で2~3日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、前記実施例3(A)項に記載の方法を用いてプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表3に示す。

#### 【0075】

#### 【表3】

表3 プラスミドpCRY30-AHAS

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ(kb)	
BamHI	1	12.0	
EcoRI	2	8.6	3.4

上記制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpCRY30-AHASと命名した。このプラスミドpCRY30-AHASの制限酵素切断点地図を図3に示す。

【0076】なお、プラスミドpCRY30-AHASにより形質転換されたプレビバクテリウム・フラバムMJ233-AHASは、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院微生物工業技術研究所に、平成4年6月10日付で：微工研菌寄第12994号(FERM P-12994)として寄託されている。

#### 【0077】実施例5

##### プラスミドpCRY30-AHASの安定性

前記のA培地100mlを500ml容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌処理したものに、実施例4で得た形質転換株プレビバクテリウム・フラバムMJ233-AHASを植菌し、30℃にて24時間振盪培養を行った後、同様にして調製したA培地100mlを500ml容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌したものに、1ml当たり50cellsの割合になるように植継し、同じく30℃にて24時間振盪培養を行った。次に遠心分離して集菌し、菌体を洗浄後、カナマイシンを15μg/mlの割合で添加したA培地及び無添加のA培地を用いて調製した平板培地に一定量塗抹し、30℃にて1日培養後生育コロニーをカウントした。

【0078】この結果、カナマイシン添加および無添加培地に生育したコロニーは同数であること、さらにA培地生育コロニーは全てカナマイシン添加培地に生育すること、すなわち該プラスミドの高度の安定性を確認した。

#### 【0079】実施例6

##### L-イソロイシンの生産

培地(尿素0.4%、硫酸アンモニウム1.4%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05%、CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O

2ppm、FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 2ppm、MnSO<sub>4</sub> · 4~6H<sub>2</sub>O 2ppm、ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 2ppm、NaCl 2ppm、ビオチン200μg/l、チアミン·HCl 100μg/l、カザミノ酸0.1%、酵母エキス0.1%) 100mlを500ml容三角フラスコに分注、滅菌(滅菌後pH 7.0)した後プレビバクテリウム・フラバム(Brevibacterium flavum) MJ233-AHASを植菌し、無菌的にエタノールを2ml加え、30℃にて2日間振盪培養を行った。

【0080】次に、本培養培地(硫酸アンモニウム2.3%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05%、FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 20ppm、MnSO<sub>4</sub> · 4~6H<sub>2</sub>O 20ppm、ビオチン200μg/l、チアミン·HCl 100μg/l、カザミノ酸0.3%、酵母エキス0.3%)の1000mlを21容通気搅拌槽に仕込み、滅菌(120℃、20分間)後、エタノール20mlと前記前培養物の20mlを添加して、回転数1000rpm、通気量1vvm、温度33℃、pH 7.6にて48時間培養を行った。

【0081】なお、エタノールは、培養中培地の濃度が2容量%を越えないように、約1~2時間ごとに断続的に添加した。培養終了後、培養物500mlから遠心分離して集菌後、脱塩蒸留水にて2度洗浄した菌体を反応液[(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g/l; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5g/l; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 20ppm; MnSO<sub>4</sub> · 4~6H<sub>2</sub>O 20ppm; チアミン塩酸塩100μg/l; α-ケト酪酸1.0%; pH 7.6]の1000mlに懸濁後、該懸濁液を21容通気搅拌槽に仕込み、エタノール20ml及びビルビン酸ナトリウム10g/lを添加して、回転数3000rpm、通気量0.1vvm、温度33℃、pH 7.6にて15時

間反応を行った。

【0082】反応終了後、遠心分離（4000 rpm、15分間、4°C）にて除菌した上清液中のL-イソロイシンを定量した。その結果、上清液中のL-イソロイシン生成量は2.3 g/lであった。この反応終了後の培養液500 mlを、強酸性陽イオン交換樹脂（H<sup>+</sup>型）のカラムに通してL-イソロイシンを吸着させ、水洗後、0.5 Nアンモニア水で溶出させた後、L-イソロイシン画分を濃縮し、冷エタノールでL-イソロイシンの結晶を折出させた。その結果、730 mgのL-イソロイシン結晶が得られた。

【0083】また、比較例として、同様の条件にて、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233（FERM BP-1497）を培養し、同様の条件にて反応させた後上清液中のL-イソロイシンを定量した。その結果、上清液中のL-イソロイシン生成量は1.2 g/lであった。

#### 【0084】実施例7

##### L-バリンの生産

培地（尿素0.4%、硫酸1.4%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05%、CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 2 ppm、FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 2 ppm、MnSO<sub>4</sub> · 4~6H<sub>2</sub>O 2 ppm、ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 2 ppm、NaCl 2 ppm、ビオチン200 μg/l、チアミン塩酸塩100 μg/l、カザミノ酸0.1%、酵母エキス0.1%）100 mlを500 ml容三角フラスコに分注、滅菌し、pH 7に調節した後、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233-AHASを植菌し、無菌的にグルコースを5 g/lの濃度になるように加え、30°Cにて2日間振盪培養を行った。

【0085】次に、本培養培地（グルコース5%、硫酸2.3%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05%、FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 20 ppm、MnSO<sub>4</sub> · 4~6H<sub>2</sub>O 20 ppm、ビオチン200 μg/l、チアミン塩酸塩100 μg/l、カザミノ酸0.3%、酵母エキス0.3%）1000 mlを21容通気搅拌槽に仕込み、滅菌（120°C、20分間）後、上記前培養物の20 mlを添加して、回転数1000 rpm、通気量1 vv

##### 配列

ATG ACA GGT GCA CAG GCA ATT GTT CGA TCG CTC GAG GAG CTT AAC GCC	48
Met Thr Gly Ala Gln Ala Ile Val Arg Ser Leu Glu Glu Leu Asn Ala	
1 5 10 15	
GAC ATC GTG TTC GGT ATT CCT GGT GCG GTG CTA CCG GTG TAT GAC	96
Asp Ile Val Phe Gly Ile Pro Gly Gly Ala Val Leu Pro Val Tyr Asp	
20 25 30	
CCG CTC TAT TCC TCC ACA AAG GTG CGC CAC GTC TTG GTG CGC CAC GAG	144
Pro Leu Tyr Ser Ser Thr Lys Val Arg His Val Leu Val Arg His Glu	
35 40 45	

m、温度33°C、pH 7.6にて24時間培養を行った。

【0086】培養終了後、培養物100 mlから遠心分離にて集菌後、脱塩蒸留水にて二度洗浄した菌体を反応液（グルコース100 g/l、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05 g/l、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05 g/l、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g/l、FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 20 ppm、MnSO<sub>4</sub> · 4~6H<sub>2</sub>O 20 ppm、チアミン塩酸塩100 μg/l、pH 8.0）50 mlに懸濁後、反応を実施した。

【0087】また、pH調整のため、乾熱滅菌（150°C、5時間加熱）した炭酸カルシウムを50 g/lの濃度で添加した。反応は500 mlの三角フラスコを用い、33°C、回転数220 rpmにて40時間振とう反応を行った。反応終了後、遠心分離（4000 rpm、15分間、4°C）にて除菌した上清液中のL-バリンを定量した。

【0088】その結果、上清中のL-バリンの生成量は2.0 g/lであった。また、比較例として、同様の条件にて、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233（FERM BP-1497）を培養し、同様の条件にて反応させた後上清液中のL-バリンを定量した。その結果、上清液中のL-バリン生成量は0.8 g/lであった。

#### 【0089】

##### 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1785

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：ブレビバクテリウム フラバム

菌株名：MJ233

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1-1785

特徴を決定した方法：P

CAG GGC GCA GGC CAC GCA GCA ACC GGC TAC GCG CAG GTT ACT GCA CCC 192  
 Gln Gly Ala Gly His Ala Ala Thr Gly Tyr Ala Gln Val Thr Gly Arg  
       50                  55                  60  
 GTT GGC GTC TGC ATT GCA ACC TCT GGC CCA GGA GCA ACC AAC TTG GTT 240  
 Val Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val  
       65                  70                  75                  80  
 ACC CCA ATC CCT GAT GCA AAC TTG GAC TCC GTT CCC ATG GTT GCC ATC 288  
 Thr Pro Ile Ala Asp Ala Asn Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile  
       85                  90                  95  
 ACC GGC CAG GTC GGA AGT GGC CTG CTG GGT ACC GAC GCT TTC CAG GAA 336  
 Thr Gly Gln Val Gly Ser Gly Leu Leu Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu  
       100                105                110  
 CCC GAT ATC CGC GGC ATC ACC ATG CCA GTG ACC AAG CAC AAC TTC ATC 384  
 Ala Asp Ile Arg Gly Ile Thr Met Pro Val Thr Lys His Asn Phe Met  
       115                120                125  
 GTC ACC GAC CCC AAC GAC ATT CCA CAG GCA TTG GCT GAG GCA TTC CAC 432  
 Val Thr Asp Pro Asn Asp Ile Pro Gln Ala Leu Ala Glu Ala Phe His  
       130                135                140  
 CTC CGG ATT ACT GGT CGC CCT GGC CCT GTT CTG GTG GAT ATT CCT AAG 480  
 Leu Ala Ile Thr Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp Ile Pro Lys  
       145                150                155                160  
 GAT GTC CAG AAC GCT GAA TTG GAT TTC GTC TGG CCA CCA AAG ATC GAC 528  
 Asp Val Gln Asn Ala Glu Leu Asp Phe Val Trp Pro Pro Lys Ile Asp  
       165                170                175  
 CTG CCA CGC TAC CGC CCA GTT TCA ACA CCA CAT GCT CGC CAG ATC GAG 576  
 Leu Pro Gly Tyr Arg Pro Val Ser Thr Pro His Ala Arg Gln Ile Glu  
       180                185                190  
 CAG GCA GTC AAG CTG ATC GGT GAG GCC AAG AAG CCC GTC CTT TAC GTT 624  
 Gln Ala Val Lys Leu Ile Gly Glu Ala Lys Lys Pro Val Leu Tyr Val  
       195                200                205  
 GGA CGC CGC GTT ATC AAG GCT GAC GCA CAC GAA GAG CTT CGT GCG TTC 672  
 Gly Gly Gly Val Ile Lys Ala Asp Ala His Glu Glu Leu Arg Ala Phe  
       210                215                220  
 GCT GAG TAC ACC CGC ATC CCA GTT GTC ACC ACC TTG ATG GCT TTG GGT 720  
 Ala Glu Tyr Thr Gly Ile Pro Val Val Thr Thr Leu Met Ala Leu Gly  
       225                230                235                240  
 ACT TTC CCA GAG TCT CAC GAG CTG CAC ATG GGT ATG CCA GGC ATG CAT 768  
 Thr Phe Pro Glu Ser His Glu Leu His Met Gly Met Pro Gly Met His  
       245                250                255  
 GGC ACT GTG TCC CCT GTT GGT GCA CTG CAG CGC AGC GAC CTG CTG ATT 816  
 Gly Thr Val Ser Ala Val Gly Ala Leu Gln Arg Ser Asp Leu Leu Ile  
       260                265                270  
 GCT ATC CGC CCT CGC TTT GAT GAC CGC GTC ACC CGT GAC GTT GAC ACC 864  
 Ala Ile Gly Ser Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Asp Val Asp Thr  
       275                280                285  
 TTC CGC CCT GAC GCC AAG ATC ATT CAC GGC GAT ATT GAT CCT GCC GAA 912  
 Phe Ala Pro Asp Ala Lys Ile Ile His Ala Asp Ile Asp Pro Ala Glu  
       290                295                300  
 ATC GGA AAG ATC AAG CAG GTT GAG GTT CCA ATC GTG GCC GAT GCC CCC 960  
 Ile Gly Lys Ile Lys Gln Val Glu Val Pro Ile Val Gly Asp Ala Arg

305	310	315	320
GAA GTT CTT GCT CGT CTG CTG GAA ACC ACC AAG GCA AGC AAG GCA GAG 1008			
Glu Val Leu Ala Arg Leu Leu Glu Thr Thr Lys Ala Ser Lys Ala Glu			
325	330	335	
ACC GAG GAC ATC TCC GAG TCG GTT GAC TAC CTC AAG GGC CTC AAG GCA 1056			
Thr Glu Asp Ile Ser Glu Trp Val Asp Tyr Leu Lys Gly Leu Lys Ala			
340	345	350	
CGT TTC CCA CGT GGC TAC GAC GAG CAG CCA GGC GAT CTG CTG GCA CCA 1104			
Arg Phe Pro Arg Gly Tyr Asp Glu Gln Pro Gly Asp Leu Leu Ala Pro			
355	360	365	
CAG TTT GTC ATT GAA ACC CTG TCC AAG GAA GTT GGC CCC GAC GCA ATT 1152			
Gln Phe Val Ile Glu Thr Leu Ser Lys Glu Val Gly Pro Asp Ala Ile			
370	375	380	
TAC TGC GCC GGC GTC GGA CAG CAC CAA ATG TGG GCA GCT CAG TTC GTT 1200			
Tyr Cys Ala Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Val			
385	390	395	400
GAC TTT GAA AAG CCA CGC ACC TGG CTC AAC TCC GGT GGA CTG GGC ACC 1248			
Asp Phe Glu Lys Pro Arg Thr Trp Leu Asn Ser Gly Gly Leu Gly Thr			
405	410	415	
ATG GGC TAC GCA GTT CCT GCG GCC CTT GGA GCA AAG GCT GGC GCA CCT 1296			
Met Gly Tyr Ala Val Pro Ala Ala Leu Gly Ala Lys Ala Gly Ala Pro			
420	425	430	
GAC AAG GAA GTC TCG GCT ATC GAC GGC GAC GGC TGT TTC CAG ATG ACC 1344			
Asp Lys Glu Val Trp Ala Ile Asp Gly Asp Gly Cys Phe Gln Met Thr			
435	440	445	
AAC CAG GAA CTC ACC ACC GCC GCA GTT GAA GGT TTC CCC ATT AAG ATC 1392			
Asn Gln Glu Leu Thr Thr Ala Ala Val Glu Gly Phe Pro Ile Lys Ile			
450	455	460	
GCA CTA ATC AAC AAC GGA AAC CTG GGC ATG GTT CGC CAA TGG CAG ACC 1440			
Ala Leu Ile Asn Asn Gly Asn Leu Gly Met Val Arg Gln Trp Gln Thr			
465	470	475	480
CTA TTC TAT GAA GGA CGG TAC TCA AAT ACT AAA CTT CGT AAC CAG GGC 1488			
Leu Phe Tyr Glu Gly Arg Tyr Ser Asn Thr Lys Leu Arg Asn Gln Gly			
485	490	495	
GAG TAC ATG CCC GAC TTT GTT GCC CTT TCT GAG GGA CTT GGC TGT GTT 1536			
Glu Tyr Met Pro Asp Phe Val Ala Leu Ser Glu Gly Leu Gly Cys Val			
500	505	510	
GCC ATC CGC GTC ACC AAA CGG GAG GAA GTA CTG CCA GCC ATC CAA AAG 1584			
Ala Ile Arg Val Thr Lys Ala Glu Glu Val Leu Pro Ala Ile Gln Lys			
515	520	525	
GCT CGA GAA ATC AAC GAC CCC CCA GTC ATC GAC TTC ATC GTC GGT 1632			
Ala Arg Glu Ile Asn Asp Arg Pro Val Val Ile Asp Phe Ile Val Gly			
530	535	540	
GAA GAC CCA CAG GTC TGG CCA ATG GTG TCT GCT GGA TCA TCC AAC TCC 1680			
Glu Asp Ala Gln Val Trp Pro Met Val Ser Ala Gly Ser Ser Asn Ser			
545	550	555	560
GAT ATC CAG TAC GCA CTC GGA TTG CGC CCA TTC TTT GAC GGC GAC GAA 1728			
Asp Ile Gln Tyr Ala Leu Gly Leu Arg Pro Phe Phe Asp Gly Asp Glu			
565	570	575	
TCA GCT GCA GAA GAC CCT GCA GAC ATT CAT GCT TCC GTT GAT TCG ACC 1776			

Ser Ala Ala Glu Asp Pro Ala Asp Ile His Ala Ser Val Asp Ser Thr

580

585

590

GAG GCA TAA

Glu Ala \*\*\*

1785

【図面の簡単な説明】

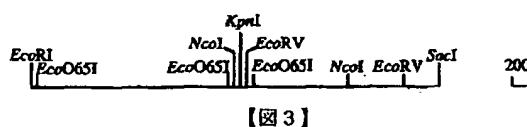
【図1】本発明のアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含む大きさが約3.4 kbのDNA断片の制限酵素切断点地図。

【図2】大きさが約3.4 kbの本発明DNA断片の塩基配列決定のための戦略図。

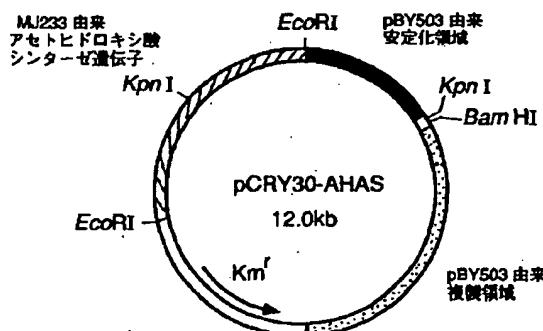
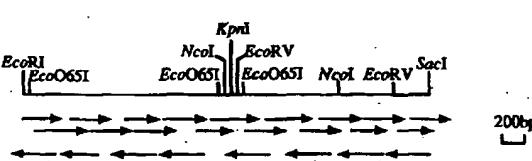
【図3】本発明のプラスミドpCRY30-AHASの制限酵素切断点地図。

【図1】

【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

府内整理番号

F I

技術表示箇所

(C 1 2 N 15/60

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 P 13/06

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 P 13/08

C 1 2 R 1:38)